Simplexa™ EBV

REF MOL2400
Rev. F

Um ensaio de PCR em tempo real para a quantificação in vitro do vírus de Epstein-Barr (EBV).

Para uso diagnóstico *in vitro*

APLICAÇÃO

O ensaio Simplexa EBV da Focus Diagnostics destina-se à quantificação in vitro de ácidos nucleicos do vírus de Epstein-Barr (EBV) em amostras de sangue total usando o ciclador 3M Integrated Cycler.

O ensaio foi concebido para uso em conjunto com a avaliação do quadro clínico e de outros marcadores laboratoriais da doença, visando ao tratamento clínico de pacientes infectados com EBV.

O ensaio não foi concebido para triagem de doadores.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O vírus de Epstein-Barr (EBV), um herpesvírus humano de ampla disseminação com tropismo por linfócitos B, é o agente causador da mononucleose infecciosa e fortemente associado à várias malignidades humanas. A infecção por EBV é comum e geralmente subclínica ou se apresenta como uma doença autolimitante com duração de 2 a 3 semanas. Como um membro da família de herpes, o EBV pode permanecer latente por longo períodos e voltar ser ativado em um estágio posterior. Embora a infecção inicial possa resultar em uma síndrome relativamente benigna, a reativação em uma pessoa imunocomprometida pode causar resultados mais graves. EBV nucleic acids or proteins have been identified in tissues affected by Burkitt's lymphoma[1], Hodgkin's disease[2-4], nasopharyngeal carcinoma[1,5], transplantation-related lymphoproliferative disorders[6-8], AIDS-related primary central nervous system lymphoma[9,10], and other B- and T-cell lymphomas[11,12].

Os métodos de diagnóstico convencionais raramente são úteis na avaliação dos distúrbios relacionados ao EBV em pacientes imunossuprimidos. A cultura não é prática nem útil para fins clínicos e a sorologia é difícil de interpretar em uma situação de imunossupressão13. Os métodos de diagnóstico baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) oferecem a possibilidade de uma detecção apropriada do EBV a partir de amostras. O monitoramento da carga viral de EBV pode ajudar a identificar os distúrbios linfoproliferativos pós-transplantes, bem como linfomas em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida[14-15].

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste consiste um sistema de amplificação e detecção por PCR em tempo real com um primer-sonda fluorescente bifuncional que detecta o DNA do vírus de Epstein-Barr no sangue total. O teste é realizado em duas etapas principais: (1) extração de DNA de amostras do paciente e (2) aplicação de um primer-sonda fluorescente bifuncional e um primer reverso para amplificar um segmento específico para análise (tanto no analito como em um controle interno). O ensaio fornece um resultado: uma região bem conservada do gene Lmp2A do genoma do EBV, que permite identificar DNA viral na amostra. O processo de extração é monitorado por um controle interno que também detecta eventuais inibições da reação de PCR. Os sinais de amplificação obtidos das amostras são comparados a uma curva de calibração e quantificados.

MATERIAIS FORNECIDOS

O kit Simplexa™ EBV da Focus Diagnostics contém quantidades de reagentes suficientes para 100 reações.

Descrição do Kit

Nome do Componente	REF	Símbolo da CE no Rótulo		Abreviação do Nome	Cor da tampa	Número de frascos	Reações por frasco ou kit	Volume por Frasco
Simplexa™ EBV Primer Mix	**MOL2401**	**REAG**	**A**	**PM**	Marrom	2	50/100	50 µl
Simplexa™ Master Mix	**MOL2000**	**REAG**	**B**	**MM**	Verde	2	50/100	200 µl
Simplexa Extraction & Amplification Control DNA	**MOL9001**	**CONTROL**	**IC**	**IC**	Azul	3	50/150	250 µl
Simplexa™ EBV Low Positive Control	**MOL2402**	**CONTROL**	**+**	**LPC**	Branca	6	1/6	200 µl
Simplexa™ EBV High Positive Control	**MOL2403**	**CONTROL**	**++**	**HPC**	Vermelha	6	1/6	200 µl

Descrição do componente

<table>
<tr><th>Componente</th><th>Descrição</th></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV Primer Mix (PM) (Mistura de primers)</td><td>Primers fluorescentes marcados com corante para quantificação de EBV e controle interno
<table>
<tr><th>Alvo</th><th>Fluoróforo da sonda (Corante)</th><th>Excitação</th><th>Emissão</th><th>Gene- alvo</th></tr>
<tr><td>EBV</td><td>FAM</td><td>495 nm</td><td>520 nm</td><td>Gene Lmp2A</td></tr>
<tr><td>Controle interno</td><td>Q670</td><td>644 nm</td><td>670 nm</td><td>Gene de A. thaliana</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Simplexa™ Master Mix (MM) (Mistura de reagentes)</td><td>DNA polimerase, tampão e desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs)</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ Extraction & Amplification Control DNA (IC) (DNA de controle para extração e amplificação)</td><td>Fragmento de DNA com 577 pares de bases derivado do gene que codifica a unidade maior da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (N-metiltransferase) da planta Arabidopsis thaliana.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV Low Positive Control (LPC) (Controle positivo baixo)</td><td>EBV inativado em matriz de base humana.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV High Positive Control (HPC) (Controle positivo alto)</td><td>EBV inativado em matriz de base humana.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV Barcode Card (Cartão de código de barras)</td><td>Parâmetros específicos do teste.</td></tr>
</table>

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

1. Padrões de Quantificação Simplexa™ EBV (REF MOL2410)
2. Ciclador 3M Integrated Cycler com o aplicativo Integrated Cycler Studio versão 3.0 ou superior
3. Universal Discs para uso com o ciclador integrado
4. Fita de cobertura de disco universal
5. [a] Sistema Roche MagNA Pure LC e material de consumo associado.
6. [a] Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Cat. N.º 03038505001)
7. [b] Equipamento bioMérieux NucliSENS® easyMAG™ e material de consumo e reagentes associados
8. [b] Pipeta multicanal Biohit/bioMérieux
9. [b] Placa em tira para ELISA
10. Micropipeta(s) individual(is) do tipo multicanal e/ou de repetição com exatidões entre 1-10 µl, 10-100 µl e 100-1.000 µl
11. Freezer (degelo manual) a temperaturas entre -10 e -30°C (para o armazenamento dos componentes congelados do kit)
12. Refrigerador a temperaturas entre 2 ºC e 8 °C (para amostras e componentes descongelados do kit)
13. Capela de biossegurança (fluxo laminar) para processamento de amostras
14. Microcentrífuga
15. Misturador de vórtex
16. Ponteiras para micropipetadores, estéreis, descartáveis, que não contenham RNase/DNase, com proteção contra aerossóis.
17. Suportes e tubos de polipropileno de 1,5 ml para microcentrífuga (tubos sem RNase/Dnase são recomendados mas não obrigatórios)
18. Luvas descartáveis sem talco
19. Água sem nuclease (para extração e como Controle sem molde (NTC, No Template Control))
20. Suportes de resfriamento para tubos de microcentrífugas de 1,5 ml

[a] Para uso com o método de extração Roche MagNA Pure LC
[b] Para uso com o método de extração bioMérieux easyMAG

VALIDADE E MANUSEIO

1. Armazene os reagentes a temperaturas entre -10 e -30 ºC (não utilize congeladores do tipo frost-free).
2. Antes do uso, deixe os reagentes descongelarem à temperatura ambiente (entre 18 e 25 °C, aproximadamente).
3. Não utilize os kits nem os reagentes fora das datas de validade.
4. Após adicionar a mistura de reagentes, use a mistura dentro de uma hora. Armazene a mistura reativa entre 2 e 8 °C até estar pronto para preparar o PCR.
5. Após descongelar, armazene a mistura de primers, a mistura de reagentes e o DNA de controle para extração e amplificação e o controle sem DNA entre 2 e 8 °C por um prazo máximo de 30 dias.
6. Não recongele a mistura de primers, a mistura de reagentes, o DNA de controle para extração e amplificação e nem os controles positivos.
7. Não misture os reagentes de lotes diferentes de kits.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*
2. Todo material de origem humana deve ser considerado potencialmente infeccioso. Os materiais-fonte (incluindo os controles) dos quais deriva este produto foram testados usando métodos aprovados pelo FDA para antígeno de superfície de

hepatite B, anticorpo contra hepatite C e HIV-1/2 (AIDS). Embora esses testes tenham sido negativos, nenhum método é 100% eficaz em descartar a possibilidade de transmissão desses ou de outros agentes infecciosos por produtos derivados de sangue humano. Portanto, todos os controles, amostras de soro e equipamentos que entrarem em contato com as amostras devem ser considerados potencialmente infectantes e descontaminados ou descartados de acordo com procedimentos adequados para risco biológico. O CDC e os National Institutes of Health recomendam que os agentes potencialmente infecciosos sejam manuseados sob condições de biossegurança de nível 2[16,17].

3. Ao lidar com os reagentes do kit use equipamentos de proteção pessoal, tais como (mas não limitados a) luvas e aventais de laboratório. Ao terminar os testes, lave cuidadosamente as mãos.
4. Não pipete com a boca.
5. Não fume, não beba, não coma, não manipule lentes de contato nem se maquile em áreas em que são usados os reagentes do kit e/ou amostras de seres humanos.
6. Descarte todos os reagentes do kit e as amostras provenientes de seres humanos que não foram utilizados, de acordo com as normas locais, estaduais e federais.
7. O fluxo de trabalho no laboratório deve ser realizado de forma unidirecional, começando pelas áreas de pré-amplificação e chegando até à área de amplificação/detecção: A sequência de eventos entre a extração da amostra e a amplificação por PCR em tempo real é a seguinte:
   - Extração da amostra, configuração do equipamento de PCR em tempo real, preparo dos reagentes e amplificação por PCR em tempo real.
   - Não utilize suprimentos e equipamentos nas áreas dedicadas a extração e ao preparo de amostras. Não é recomendável nenhum movimento cruzado entre as diferentes áreas.
   - Os suprimentos e equipamentos utilizados para o preparo de amostras não devem ser usados para atividades de preparação de reagentes nem para o processamento de DNA amplificado ou de outras fontes de ácido nucleico alvo.
   - Todos os suprimentos e equipamentos de amplificação devem ser mantidos na área reservada ao equipamento de PCR em tempo real.
   - Os equipamentos de proteção pessoal, tais como aventais de laboratório e luvas descartáveis, devem ser específicos de cada área.
8. A contaminação de amostras de pacientes ou de reagentes pode originar resultados errados. Empregue técnicas assépticas.
9. Pipete e manuseie cuidadosamente os reagentes para evitar misturar amostras entre cavidades adjacentes.
10. Empregue técnicas de pipetagem apropriadas e mantenha sempre o mesmo padrão de pipetagem ao longo de todo o procedimento para garantir valores exatos e reprodutíveis.
11. Não substitua nem misture reagentes de diferentes lotes do kit e nem com os de outros fabricantes.
12. Não troque as tampas dos tubos de reagentes. Isso pode causar contaminação e comprometer os resultados do teste.
13. Utilize exclusivamente o protocolo descrito neste folheto. Digressões do protocolo ou o uso de intervalos de tempo ou de temperaturas que não os especificados podem originar resultados errados.
14. A configuração do teste deve ser realizada à temperatura ambiente (entre 18 a 25 °C, aproximadamente). Enquanto estiver misturando os reagentes, mantenha as enzimas resfriadas, através do uso de um bloco de resfriamento.
15. Não reutilize Discos universais já expostos a reagentes ou a amostras de pacientes.
16. Descarte os discos usados sem destacar a fita de cobertura.
17. Se diferentes kits ou lotes de Simplexa™ forem usados no mesmo disco, é necessário testar os controles positivos e o controle sem DNA de cada kit.
18. A mistura de reagentes contém mais que 1% de glicerol, o que pode causar irritação quando inalada ou em contato com a pele. Se ocorrer inalação ou contato com a pele, deve-se tomar medidas de primeiros socorros.
19. A armazenagem prolongada de amostras extraídas entre 2 ºC e 8 °C não é recomendada, pois não se sabe quais são os efeitos desse procedimento no desempenho do teste.
20. Não utilize o kit se a embalagem ou o conteúdo estiver quebrado ou danificado e entre em contato com a Focus Diagnostics. As informações para contato estão na última página deste documento.

INSTRUÇÕES DE USO

A. COLETA DE AMOSTRAS

O tipo de amostra aceitável é o sangue total colhido por punção venosa. Não use tubos de coleta com o anticoagulante heparina, pois a heparina inibe a PCR.

B. ÁREA DE EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS

O DNA deve ser extraído das amostras e controle em uma área separada. A amostra deve ser preparada para extração em uma capela de biossegurança.

Extração pelo método Roche MagNA Pure LC

1. O DNA de amostras de pacientes e de controles do ensaio deve ser extraído com o kit Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid Kit usando o extrator Roche MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor. Para obter informações sobre como utilizar o kit, consulte as instruções fornecidas pelo fabricante.
2. No menu suspenso “Protocol” [“Protocolo”], do MagNA Pure LC System, selecione “Total NA” e depois “Total NA Variable_elution_volume.blk” na lista. As configurações apropriadas para a sequência serão carregadas.
3. O protocolo de amostra deve ser “Total NA Variable_elution_volume”.
4. O volume da amostra (Sample Volume) deve ser de 200 µl e o volume de eluição deve ser de 50 µl.
5. O volume de diluição deve ser zero para todas as amostras.

6. Verifique se o Post Elution Protocol está em “None”.
7. Verifique se as amostras e os controles estão posicionados corretamente no cartucho de amostra
8. Agite em vórtex as amostras LPC e HPC por 2 a 4 segundos e centrifugue rapidamente para depositar o conteúdo na parte inferior do tubo.
9. Pipete 200 µl de cada amostra (LPC, HPC e NTC) na posição correspondente no cartucho de amostra.
10. Inspecione visualmente o nível de amostra e dos controles no cartucho de amostra para verificar se a(s) amostra(s) foram adicionadas.
11. Agite brevemente o DNA de controle para extração e quantificação (IC) no vórtex duas vezes e centrifugue rapidamente para depositar o conteúdo na parte inferior do tubo.
12. Para cada conjunto de 16 amostras (amostras 1 a 16), pipete 100 µl da (IC) em 6 ml de tampão de lise em um tubo cônico. Agite brevemente em vórtex para misturar. Coloque-o na bandeja apropriada do equipamento de extração MagNA Pure.
    - Por exemplo, se forem extraídas mais de 16 amostras (17-32 amostras), pipete 200 µl de IC em 12 ml de tampão de lise em um tubo cônico. Agite brevemente em vórtex para misturar. Coloque-o na bandeja apropriada do equipamento de extração MagNA Pure.
13. Coloque o cartucho de amostra no extrator MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid e inicie a sequência de extração.
14. Ao final da extração de ácidos nucleicos, o cartucho com os controles extraídos e as amostras do paciente podem ser extraídas do MagNA Pure e seladas. Armazene o DNA extraído entre 2ºC e 8ºC antes de usá-lo. Recomenda-se não armazenar amostras a esta temperatura por períodos prolongados. Mantenha as amostras de DNA extraído em um bloco de refrigeração enquanto carregar o disco.

Extração pelo método bioMérieux NucliSENS® easyMAG™

1. O Manual de Instruções NucliSENS® easyMAG™ contém instruções sobre como usar o equipamento e o software.
2. Selecione o template Generic no software NucliSENS® easyMAG™ com as seguintes configurações:

Default Request [Solicitação padrão]:	Generic 2.0.1 (ou equivalente)
Run Name Prefix [Prefixo do nome da sequência]:	(conforme apropriado)
Sample ID prefix [Prefixo da ID da sequência]:	(conforme apropriado)
Sample Type [Tipo de amostra]:	Primária
Workflow Defaults: [Padrões da sequência]:	On-board lysis Incubation [Incubação de lise on-board] On-board Silica Incubation [Incubação de sílica on-board] Sample Addition Guidance Off [Instrução para Adição de Amostra Desligado]
Reagent Tracking [Rastreamento de reagentes]:	Lysis, Silica, Internal Control reagent tracking disabled [Rastreamento de reagente de lise, sílica, controle interno desabilitado]

3. Digite as seguintes informações sobre amostras individuais na tela Extraction Request [Solicitação de Extração].

Sample ID [ID da amostra]:	(Digitar nome da amostra.)
Request [Solicitação]:	Generic 2.0.1 (ou equivalente)
Volume (ml):	0,100
Eluate [Eluído] (µl):	25
Type [Tipo]:	Primary [Primária]
Priority [Prioridade]:	Normal
Matrix [Matriz]:	Other [Outros]

4. Crie a sequência de extração no NucliSENS® easyMAG™ conforme descrito no Manual do Usuário.
5. Agite em vórtex as amostras LPC e HPC por 2 a 4 segundos e centrifugue rapidamente para depositar o conteúdo na parte inferior do tubo.
6. Pipete 100 µl da amostra (LPC, HPC ou NTC) no(s) recipiente(s) de amostra.
7. Agite a IC no vórtex brevemente duas vezes e centrifugue rapidamente para depositar o conteúdo na parte inferior do tubo.
8. Pipete 5 µl de IC nas cavidades com amostras e nas cavidades de controle usando uma ponteira separada para cada amostra.
9. Coloque o(s) recipiente(s) com amostra(s), o material descartável usado para aspiração e os reagentes no easyMAG™ de acordo com as instruções no Manual do Usuário.
10. Inicie a lise no equipamento e incube as amostras lisadas por dez minutos antes de adicionar a mistura com sílica magnética.
11. Durante o período de incubação e lise, prepare e mistura de sílica magnética. Misture a sílica e dilua em água sem nuclease misturando 1 parte de sílica magnética para cada 1 partes de água sem nuclease (p.ex. 540 µl de sílica magnética+ 540 µl de água sem nuclease). Prepare pelo menos 135 µl de mistura de sílica magnética por amostra.

12. Para transferir a mistura de sílica para as cavidades na tira de ELISA, misture a sílica magnética utilizando uma ponteira no modo de operação P2 da pipeta Biohit. Pressione Start para aspirar 1050 µl da mistura de sílica magnética e Start novamente para dispensar a primeira parte de volta no tubo de mistura de sílica. Pressione Start para dispensar 125 µl da mistura de sílica magnética em 8 cavidades individuais da tira de ELISA. Repita conforme necessário para novas placas ELISA.
13. Após incubação de lise por 10 minutos, use a pipeta Biohit com 8 ponteiras (para uma tira de ELISA) e no modo de operação P3 para transferir 100 µl da mistura de sílica magnética a cada amostra do recipiente de amostras. Coloque as ponteiras nas cavidades da tira de ELISA e pressione Start para misturar e aspirar a mistura de sílica magnética.
14. Coloque a mistura de sílica magnética nos recipientes apropriados e posicione a(s) ponta(s) da(s) pipeta(s) nas amostras abaixo do nível do líquido. Pressione Start para aspirar, dispensar e misturar (3 vezes) a sílica magnética e as amostras. Mantenha as pontas das pipetas abaixo do nível do líquido para garantir a mistura correta.
15. Repita as etapas 13 e 14 para os outros recipientes com amostras.
16. Após adicionar sílica magnética a todos os recipientes com amostra, inicie a sequência de extração.
17. Ao final da sequência, retire os recipientes com amostra do instrumento. Se não for usar imediatamente as amostras, coloque-as em tubos separados para reduzir as chances de a sílica magnética cair de volta na amostra. Armazene o DNA extraído entre 2 ºC e 8 ºC antes de usar. Recomenda-se não armazenar amostras a esta temperatura por períodos prolongados. Mantenha o DNA extraído em um bloco de refrigeração ao carregar o disco.

C. CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE PCR EM TEMPO REAL

1. O Manual do Operador do Integrated Cycler contém instruções sobre como configurar o programa Integrated Cycler Studio e incluir definições de ensaios, programar e analisar sequências no equipamento.

Nota: Antes de iniciar corridas de previsão, deve-se obter uma curva-padrão válida (sequência de calibração).

D. ÁREA DE PREPARO DOS REAGENTES

Área dedicada ao preparo da mistura de reagente do ensaio Simplexa™ EBV.

1. Descongele a mistura de primers e a mistura de reagentes em temperatura ambiente (entre 18 e 25 °C, aproximadamente). Cada frasco de componente do kit contém quantidade suficiente de reagentes para 50 reações. Antes de cada uso, misture suavemente, por meio de 6 a 8 inversões, os componentes da mistura de primers e da mistura de reagentes e centrifugue rapidamente para precipitar os conteúdos no fundo do tubo.
2. Pipete o volume de cada componente, conforme indicado na tabela a seguir, para preparar o volume necessário da mistura reativa em um tubo de microcentrifugação de polipropileno e de tamanho adequado.

Volumes da mistura reativa

Reagente	Volumes de mistura reativa para 1 reação	Volumes de mistura reativa para 10 reações
Simplexa™ Master Mix	4,0 µl	40 µl
Simplexa™ EBV Primer Mix	1,0 µl	10 µl
Volume Total	5,0 µl	50 µl

3. Misture suavemente a mistura reativa por inversões ou por 8 a 10 pipetagens.
4. Centrifugue brevemente para decantar o conteúdo na parte inferior do tubo.
5. Configure a PCR.
6. Após o preparo da mistura reativa, use-a em até uma hora. Armazene a mistura reativa entre 2 e 8 °C se o PCR não for preparado imediatamente após a preparação da mistura reativa.

E. ÁREA DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Prepare o disco universal de 96 cavidades para o teste Simplexa™ EBV em uma área separada.

Consulte o exemplo de disposição do disco na Seção C ao executar a seguinte configuração:

1. Adicione 5,0 µl da mistura reativa em cada cavidade.
2. Adicione 5,0 µl dos controles positivos extraídos à cavidade “HPC” e “LPC”.
3. Adicione 5,0 µl da amostra extraída do paciente à cavidade “S” apropriada.
4. Adicione 5,0 µl do No-Template Control à cavidade “NTC”.
5. Cubra o disco com a Universal Disc Cover Tape (Fita de Cobertura de Disco Universal).
6. Abra a tampa do Integrated Cycler.
7. Coloque o Universal Disc selado sobre a plataforma.
8. Feche a tampa com cuidado.
9. Clique em **Run [Efetuar corrida]**.
10. Clique em **Start [Iniciar]**.

F. ANÁLISE DE DADOS

1. Ao término da sequência, clique em **Analyze [Analisar]**.
2. Escolha os **dyes (corantes)** um de cada vez ou selecione todos os corantes (canais) marcando a caixa de seleção ao lado de cada corante.
3. Pressione o botão **Print Preview [Visualizar impressão]**, na parte inferior à direita para rever um resumo dos valores preditivos. Marque a caixa de seleção **Include Graphs [Incluir gráficos]** para visualizar os gráficos de amplificação. Marque a caixa de seleção **Include Calibration Result [Incluir resultado de calibração]** para incluir o relatório de

calibração associado à sequência de previsão. Role página por página utilizando os botões de setas existentes no canto esquerdo superior da janela Print preview [Visualizar impressão].
4. Imprima ou Salve o relatório, conforme necessitar.
5. Exporte os valores preditivos, se necessário.

CONTROLE DE QUALIDADE

Cada laboratório deve estabelecer suas próprias faixas de controle de qualidade e a frequência de execução dos testes de controle de qualidade tendo como base as leis e regulamentos locais aplicáveis, bem como as boas práticas padrão de laboratório.

COMO RELATAR OS RESULTADOS

1. Teste de validade

   Para verificar se a sequência foi válida, observe os resultados de EBV e Internal Control (IC) do Low Positive Control (LPC), High Positive Control (HPC) e No-Template Control (NTC). Uma sequência só será válida se os três controles atenderem aos critérios de aceitação. Se uma sequência for considerada inválida, todas as amostras deverão ser retestadas.

Critérios de aceitação

Controle	EBV	Extraction & Amplification Control DNA (IC)
No Template Control (NTC)	Não detectado	Detectado
Low Positive Control (LPC)	Dentro da tolerância indicada na documentação do lote	Não aplicável
High Positive Control (HPC)	Dentro da tolerância indicada na documentação do lote	Não aplicável

- Para o NTC ser considerado aceitável, os resultados devem ser EBV Not Detected e IC Detected. A detecção de EBV no NTC significa que as amostras podem ter sido contaminadas durante o processamento.
- Para o LPC ser considerado aceitável, os resultados devem ser EBV Detected e LPC dentro dos limites de tolerância indicados na documentação do lote. O resultado do IC pode ser Detected, mas isto não é obrigatório.
- Para o HPC ser considerado aceitável, os resultados devem ser EBV detected e HPC dentro dos limites de tolerância indicados na documentação do lote. O resultado do IC pode ser Detected, mas isto não é obrigatório.

2. Interpretação dos Resultados

Interpretação dos Resultados

Exemplo	Valor de EBV	Valor de IC*	Interpretação
1	Não detectado	Detectado	EBV não detectado
2	< 900 cópias/ml	Não se aplica	EBV detectado abaixo do LLoQ (Lower Limit of Quantitation).
3	X cópias/ml	Não se aplica	EBV detectado a uma concentração específica
4	> 8,07 x 10^8 cópias/mL	Não se aplica	EBV detectado acima do ULoQ (Upper Limit of Quantitation).
5	Não detectado	Não detectado	Resultado inválido; realizar nova extração e repetir o ensaio.

3. Resultado da validação de amostras

   Uma amostra será considerada validada se atender aos três critérios abaixo:

   1. EBV não detectado e IC detectado.
   2. EBV detectado. Um resultado positivo para EBV não requer detecção de IC.
   3. As curvas de amplificação devem ser analisadas para cada resultado, sobretudo se houver uma mensagem “Data Quality” (qualidade dos dados). Uma curva de amplificação válida exibe um crescimento exponencial progressivo. Consulte o manual do operador sobre as ações recomendadas.

LIMITAÇÕES

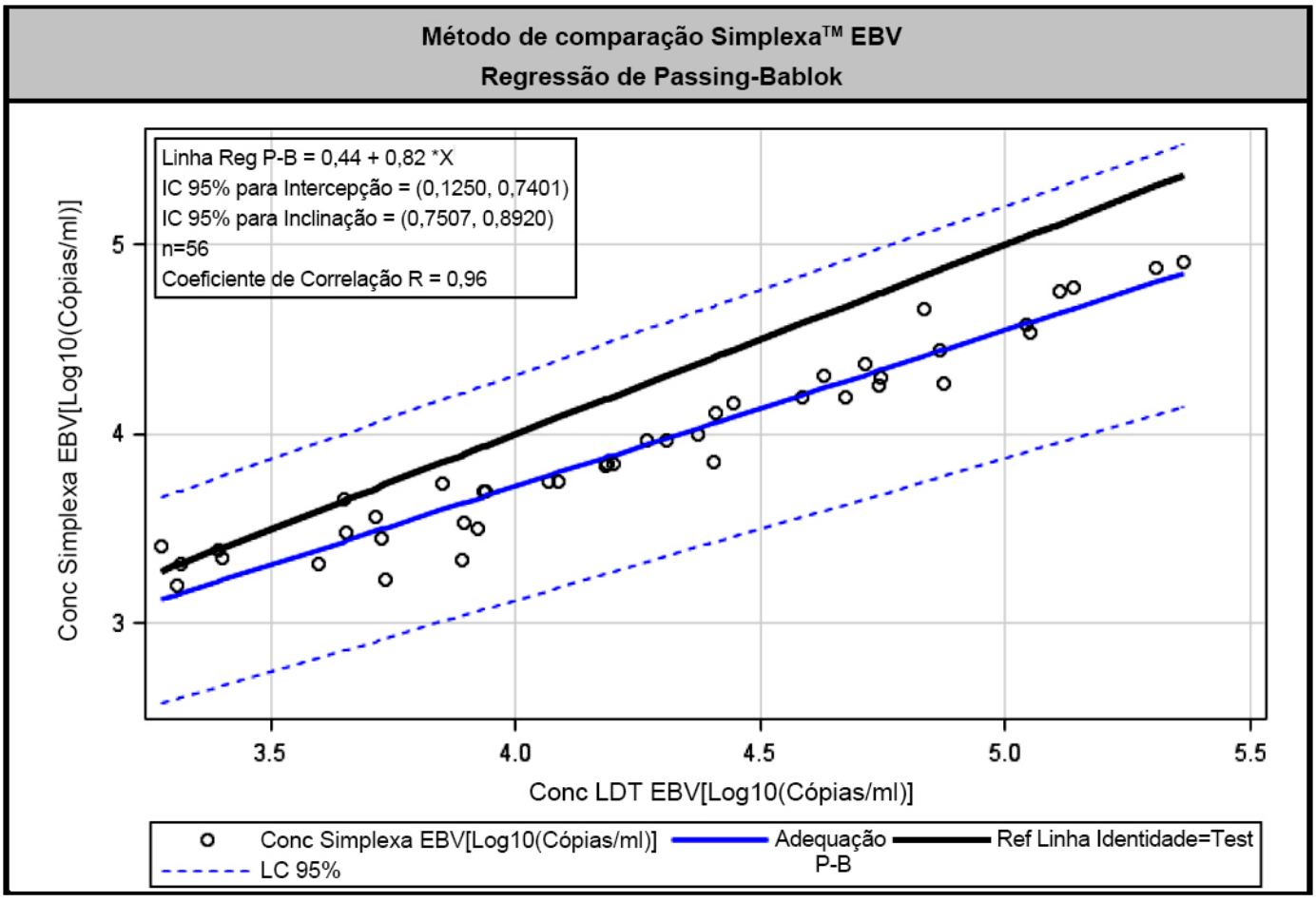
1. Os analistas devem ser treinados e ficarem familiarizados com os procedimentos do teste e a interpretação dos resultados antes de executarem o teste.
2. O aplicativo Integrated Cycler Studio armazena o último arquivo de calibração válido usado para quantificar amostras de pacientes. Os padrões de quantificação e as amostras de pacientes devem ser extraídas usando-se a mesma metodologia de extração, ou o ensaio pode produzir resultados incorretos.
3. Ao se monitorar um paciente, o método de extração usado para preparar a determinação inicial da amostra deve ser usado para todas as determinações subsequentes.
4. Todos os resultados deste e de outros testes devem ser correlacionados com o quadro clínico, dados epidemiológicos e outras informações disponíveis ao clínico responsável pelo paciente.
5. A prevalência da infecção afeta o valor preditivo do teste.

6. Como em outros testes, os resultados negativos não descartam a infecção por EBV.
7. Os resultados falsos negativos podem ocorrer quando o organismo infectante apresenta mutações, inserções, deleções, rearranjos genômicos ou quando o teste for realizado em fases muito precoces da doença.
8. Os resultados falsos negativos podem ocorrer se o número de microorganismos presentes na amostra for inadequado em virtude de coleta, transporte ou manuseio inadequados.
9. Como acontece com outros testes, podem ocorrer resultados falsos positivos. Em algumas circunstâncias, poderá ser indicada a repetição do teste ou a execução do teste com outro dispositivo.
10. O desempenho desse teste não foi estabelecido para uso em triagem de doadores.
11. O desempenho deste teste não foi estabelecido com medicações potencialmente interferentes no tratamento da mononucleose infecciosa.
12. Este teste não exclui a presença de doenças causadas por outros patógenos bacterianos ou virais.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS

Um local interno de testes participou do Estudo de Concordância Clínica. Foram gerados resultados de referência usando um teste desenvolvido em laboratório (LDT, Laboratory Developed Test) de alto desempenho. Um total de 56 amostras de sangue total foi obtido de uma combinação de amostras coletadas prospectivamente, que foram testadas no local de coleta para detecção ou quantificação de EBV. As amostras foram extraídas com o método de extração MagNA Pure. As amostras incluídas na análise estavam de acordo com o intervalo de resultado combinado do LDT e ensaio Simplexa EBV. A regressão de Passing-Bablok obteve uma inclinação de 0,82 e um viés consistente de 0,44.



REPRODUTIBILIDADE

O estudo de reprodutibilidade foi realizado em dois sistemas, um operador por sistema, quatro repetições de cada amostra do painel por sequência, duas sequências por dia durante cinco dias. As amostras do painel de reprodutibilidade consistem em amostras de sangue total semeadas com concentrações variáveis de uma cepa de EBV. O painel contém controles (NTC, HPC e LPC), um agregado negativo (sangue total não semeado), um agregado baixo (semeado na concentração de aproximadamente 2 a 4 vezes o limite de detecção (LoD)), um agregado médio (aproximadamente 8 a 10 vezes o LoD) e um agregado elevado (limite superior do ensaio). Além disso, cada nível do padrão de quantificação, extraído de um lote do conjunto de Padrões de

Quantificação (QS) (n=5), foi incluído no painel. Os resultados de reprodutibilidade para cada amostra do painel estão apresentados na tabela abaixo.

Reprodutibilidade do Simplexa™ EBV									
					Desvio Padrão				
Nome da amostra	**Concentração Esperada (cópias/ml)**	**Média geométrica (cópias/ml)**	**Média dos logaritmos (cópias/ml)**	**No. de Resultados Mensuráveis**	**Entre Equipamentos**	**Entre Dias**	**Entre Na sequência**	**Variação Na sequência**	**Total**
NTC	0	Não detectado	Não detectado	0	Não se aplica				
HPC	$2,13 \times 10^5$	$1,97 \times 10^5$	5,29	80	0,17	0,03	0,02	0,01	0,17
LPC	$4,66 \times 10^3$	$5,67 \times 10^3$	3,75	80	0,19	0,02	0,03	0,04	0,19
QS-1	$3,61 \times 10^8$	$3,66 \times 10^8$	8,56	80	0,21	0,07	0,00	0,22	0,32
QS-2	$3,91 \times 10^6$	$4,55 \times 10^6$	6,66	80	0,18	0,05	0,01	0,02	0,18
QS-3	$4,02 \times 10^4$	$5,01 \times 10^4$	4,70	80	0,21	0,03	0,01	0,02	0,21
QS-4	$4,72 \times 10^3$	$5,85 \times 10^3$	3,77	80	0,20	0,03	0,02	0,04	0,21
QS-5	$1,03 \times 10^3$	$1,42 \times 10^3$	3,15	49	0,12	0,00	0,01	0,11	0,16
Agregado elevado	$1,0 \times 10^7$	$1,55 \times 10^8$	8,19	67	0,25	0,13	0,13	0,05	0,31
Agregado médio	$9,0 \times 10^3$	$9,41 \times 10^3$	3,97	80	0,26	0,17	0,10	0,07	0,33
Agregado baixo	$3,6 \times 10^3$	$4,23 \times 10^3$	3,63	78	0,35	0,13	0,08	0,07	0,39
Agregado negativo	0	Não detectado	Não detectado	0	Não se aplica				

SENSIBILIDADE ANALÍTICA E LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção (LoD) foi calculado com amostras criadas artificialmente de uma solução de estoque com uma cepa quantificada de EBV usada para inocular matriz clinicamente negativa de sangue total. O painel incluiu uma amostra negativa (matriz não semeada) e amostras com concentrações variadas, com diluições seriadas, em torno do LoD aproximado. Vinte e quatro (24) replicações de três (3) diferentes extrações e sequências de PCR para cada nível foram analisadas por análise de probitos para determinar a menor concentração detectável com exatidão, com 95% de probabilidade. O protocolo do LoD foi executado para cada um dos dois métodos de extração. Os valores individuais de LoD são apresentados na tabela abaixo. O LoD para o ensaio EBV baseado no LoD mais elevado para ambos os métodos de extração foi determinado como 900 cópias/ml.

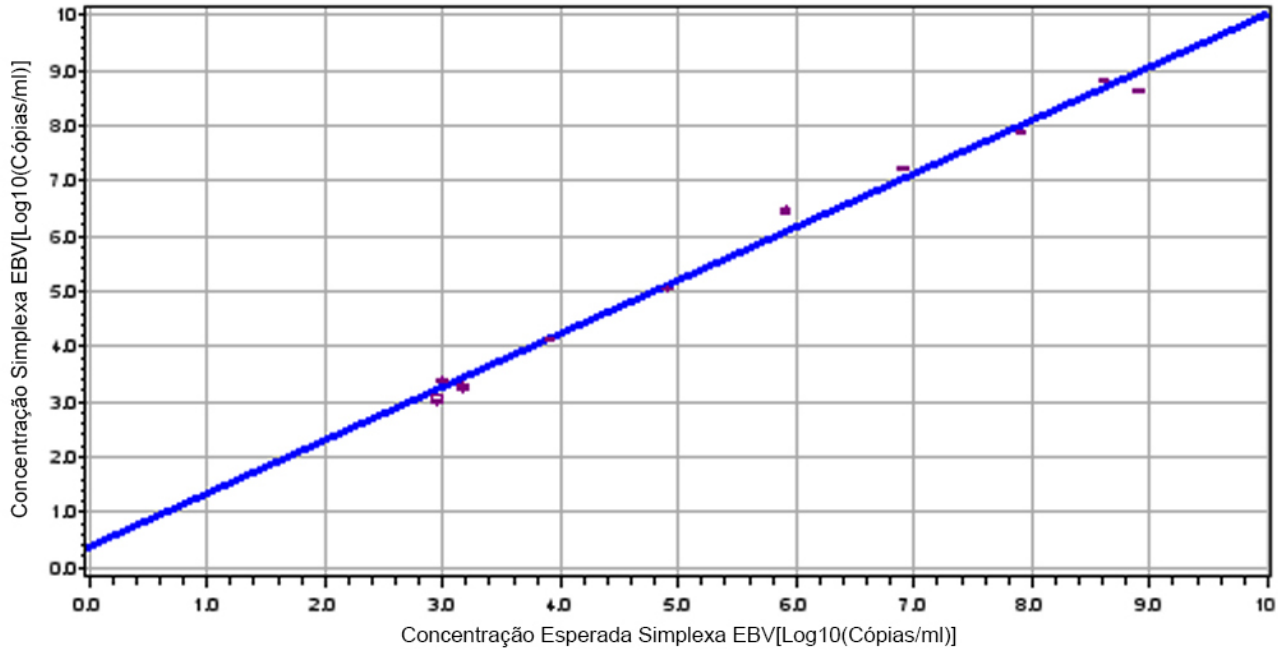
	Sangue Total	
	MagNA Pure	**easyMag**
cópias/ml	**900**	**698**

LINEARIDADE

A linearidade foi determinada a partir de amostras obtidas de uma solução de estoque contendo uma cepa quantificada de EBV usada para inocular matriz clinicamente negativa de sangue total. O painel consistia em pelo menos 10 agregados de cópias conhecidas em todo o intervalo onde se esperava desempenho linear. Nos agregados, pelo menos três concentrações estavam próximas do limite inferior de quantificação (LLOQ), duas estavam próximas do limite superior de quantificação (ULOQ) e as restantes apresentaram distribuição aproximadamente uniforme entre o LLOQ e o ULOQ. Cada amostra foi testada aleatoriamente em pelo menos três replicações. O protocolo do linearidade foi executado em cada um dos dois métodos de extração. Os valores individuais da faixa reportável são apresentados na tabela abaixo.

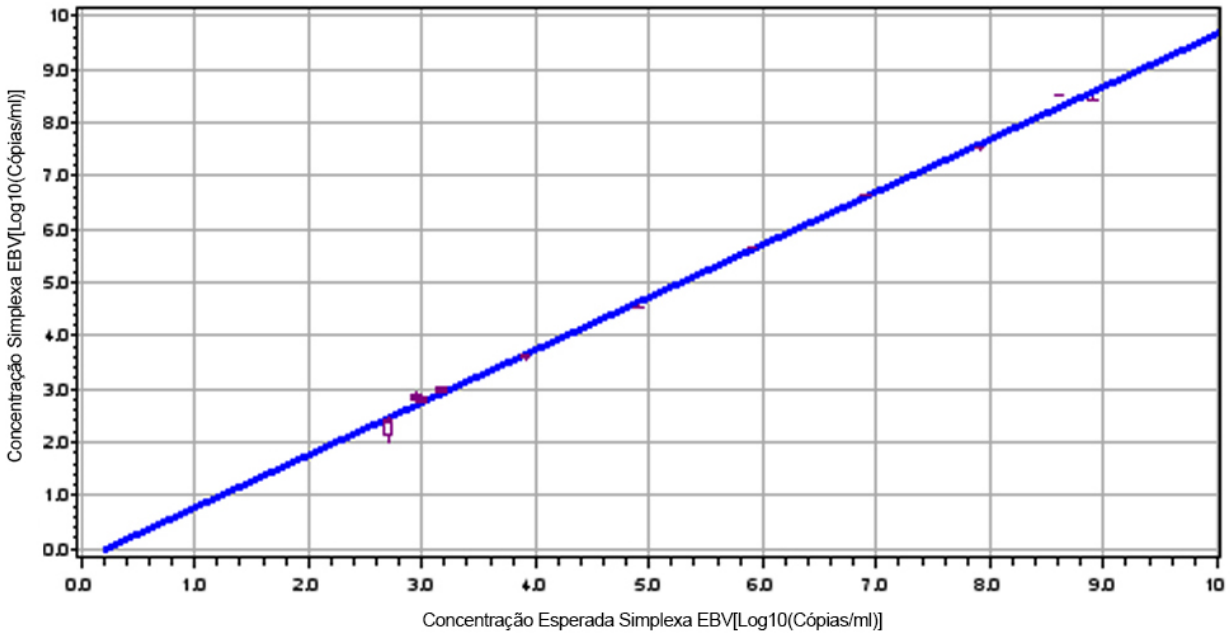
	Sangue Total	
	MagNA Pure	**easyMag**
cópias/ml	**900** a **$8,07 \times 10^8$**	**900** a **$8,07 \times 10^8$**

Linearidade do Simplexa™ EBV – extração MagNA Pure



Equação de Regressão:
Log_Simplexa_EBV = 0,370351 + 0,965335*Log_Expected_EBV

Linearidade do Simplexa™ EBV – extração easyMag



Equação de Regressão:
Log_Simplexa_EBV = -0,216626 + 0,969417*Log_Expected_EBV

INTERVALO DE RESULTADO

Os dois métodos de extração foram lineares até 8,07 × 1088 cópias/ml. A faixa reportável do ensaio foi baseada no método de extração com o valor mais elevado para o limite inferior de quantificação da faixa linear. Amostras abaixo da faixa linear serão descritas como < 900 cópias/ml, e as amostras acima da faixa linear serão descritas como >8,07 x 1088 cópias/ml.

REATIVIDADE ANALÍTICA/ REATIVIDADE CRUZADA

Os estudos indicaram que os primers são específicos para EBV e não apresentaram reação cruzada com outros vírus ou bactérias HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, HHV-8, HTLV-1, JCV, Parvovirus, Toxoplasma gondii, VZV, CMV e BKV Além disso, os bancos de dados da sequência de ácido nucleico indicaram que os primers foram específicos para EBV e que não apresentaram homologia significativa com outros patógenos ou com DNA humano.

INTERFERÊNCIAS

O desempenho deste ensaio não foi avaliado com substâncias potencialmente interferentes. O processo de extração automatizado de ácido nucleico, com sistema MagNA Pure ou com NucliSENS easyMAG, remove eficazmente as impurezas da amostra, já que isola e lava os ácidos nucleicos durante o processo de extração. Os controles internos alertam o usuário final quanto à potencial inibição de PCR; se todos os alvos e controle interno não forem detectados, o ensaio não é válido.

CONTAMINAÇÃO POR CARREAÇÃO

O transporte de amplificação foi avaliado para o equipamento e para o Universal Disc usando outros testes. Os estudos procuraram a presença de contaminação em amostras negativas altas. O estudo foi concebido colocando alternadamente uma amostra positiva forte e uma amostra negativa forte em cada disco. A contaminação por carreação foi avaliada comparando-se a taxa de resultados negativos obtidos com a amostra negativa alta com a taxa esperada sob condições de reprodutibilidade normais. Em testes prévios, não foi observado nenhum efeito de contaminação por carreação.

REFERÊNCIAS

1. Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt's tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature 1970; 228:1056-8.
2. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein-Barr virus genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. N Engl J Med 1989; 320:502-6.
3. Herbert H, Steinbecher E, Niedobitek G, et al. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease. Blood 1992; 80:484-91.
4. Khan G, Norton AJ, Slavin G. Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. Relation to age and subtype. Cancer 1993; 1:3124-9.
5. Young LS, Dawson CW, Clark D, et al. Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. J Gen Virol 1988; 69:1051-65.
6. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, et al. The Epstein-Barr virus in the pathogenesis of post-transplant lymphoma. Transplant Proc 1981; 13:756-60.
7. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, et al. Epstein-Barr virus induced B-cell lymphoma after renal transplantation. Acyclovir therapy and transition from polyclonal to monoclonal B-cell proliferation. N Engl J Med 1982; 306:913-8.
8. Borisch B, Gatter KC, Tobler A, et al. Epstein-Barr virus-associated anaplastic large cell lymphoma in renal transplant recipients. Am J Clin Pathol 1992; 98:312-8.
9. Cinque P, Brytting M, Vago L, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. Lancet 1993; 342:398-401.
10. Arribas JR, Clifford DB, Fichtenbaum CJ, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma. J Clin Microbiol 1995; 33:1580-1583.
11. Gaillard F, Mechinaud-Lacroix F, Papin S, et al. Primary Epstein-Barr virus infection with clonal T-cell lymphoproliferation. Am J Clin Pathol 1992; 98:324-33.
12. Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, et al. T cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. N Engl J Med 1988; 318:733-41.
13. Telenti A. Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders: basic concepts and diagnostic approach. Clin. Immunol. Newsl. 1991; 11:81-88.
14. Au W-Y et al, Quantification of circulating Epstein-Barr virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBV-positive lymphomas in immunocompetent patients. Blood, 1 July 2004 _ Volume 104, Number 1; 243-249
15. Cornelissen J, Molecular monitoring of EBV-positive lymphoma. Blood, 1 July 2004 _ Volume 104, Number 1; 9
16. NCCLS H18-A2. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. 2nd Ed.
17. CDC-NIH Manual. (1999) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th ed. And National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of Laboratory Workers from Instruments, Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue (NCCLS M29-A).

A utilização de sondas Scorpions® em diagnóstico humano in vitro é contemplada por uma licença concedida à Focus Diagnostics, Inc. pela DxS, Ltd. Black Hole Quencher™, CAL Fluor™ e Quasar™ dyes são marcas registradas da Biosearch Technologies, Inc. ('BTI'). As tecnologias Black Hole Quencher, CAL Fluor e Quasar dye estão licenciadas graças a um acordo com a BTI e estes produtos são vendidos exclusivamente para fins de clínica, diagnóstico ou pesquisa e desenvolvimento.

REPRESENTANTE AUTORIZADO
mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 30855, Langenhagen-Hannover, Alemanha

INFORMAÇÕES SOBRE PEDIDOS

Telefone:	**(800) 838-4548 (EUA)**	**(562) 240-6500 (Internacional)**
Fax:	**(562) 240-6510**	

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Telefone:	(800) 838-4548 (EUA)	(562) 240-6500 (Internacional)
Fax:	(562) 240-6526	

Visite nossa página na web:www.focusdx.com

PI.MOL2400.OUS.PT
Rev. FData da edição:
13 de dezembro de 2012

Cypress, Califórnia 90630 EUA